温室粉虱和烟粉虱3个隐种中热激蛋白基因 *hsp*70 和 *hsp*90 含量的比较分析

韦 姣[1]，吕志创[1]，王 韧[1]，万方浩[1,2,*]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点研究室，北京 100193；
2. 农业部外来入侵生物预防与控制研究中心，北京 100193）

摘要：【目的】昆虫适应新环境的能力与其对温度的耐受能力密切相关。热激蛋白 HSP70 和 HSP90 具有提高生物体温度耐受性的功能。烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)不同隐种和不同种粉虱对温度的适应能力有差异，这与它们的热激蛋白基因拷贝数的差异可能相关。【方法】利用实时荧光定量 PCR 方法，检测入侵型烟粉虱 MED 隐种和 MEAM1 隐种、本地型烟粉虱 AsiaⅡ1 隐种以及温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)基因组 DNA 中热激蛋白基因 *hsp*70 和 *hsp*90 的拷贝数。【结果】不同种类的粉虱和烟粉虱不同隐种体内的 *hsp*70 和 *hsp*90 的含量均有较大差异，其中 *hsp*70 和 *hsp*90 拷贝数在入侵型烟粉虱 MED 和 MEAM1 隐种中含量较其他两种均高，而在土著种 AsiaⅡ1 隐种中含量最低，在温室粉虱中居中。此外，相同物种雌雄成虫 *hsp*70 和 *hsp*90 的拷贝数也不同，雌虫 *hsp*70 和 *hsp*90 拷贝数约为雄虫的 2 倍。【结论】不同种粉虱及烟粉虱不同隐种的 *hsp*70 和 *hsp*90 的拷贝数可能与其耐热性差异相关。本研究为解释不同种粉虱、烟粉虱不同隐种及其不同性别的耐热性差异机制提供了进一步的依据。

关键词：烟粉虱；温室粉虱；热激蛋白基因；耐温性；实时荧光定量 PCR；拷贝数

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2014)06-647-09

Comparative analysis of the copy numbers of *hsp*70 and *hsp*90 in *Trialeurodes vaporariorum* and three cryptic species of *Bemisia tabaci* complex (Hemiptera: Aleyrodidae)

WEI Jiao[1], LÜ Zhi-Chuang[1], WANG Ren[1], WAN Fang-Hao[1,2,*] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Center for Management of Invasive Alien Species, Ministry of Agriculture, Beijing 100193, China)

Abstract: 【Aim】Insects' ability to adapt to new environment is closely related to their tolerance to different temperatures. Heat shock proteins HSP70 and HSP90 play important roles in improving stress resistance in insects, especially the thermo tolerance. Different whitefly species and different cryptic species of *Bemisia tabaci* complex show different tolerance to temperature stress, which may be related to the difference in the copy numbers of the Hsp genes of these species. 【Methods】The copy numbers of *hsp*70 and *hsp*90 in *Trialeurodes vaporariorum* and three cryptic species (two invasive species MED and MEAM1, and one native species AsiaⅡ1) of *B. tabaci* complex were detected by using absolute real-time quantitative PCR. 【Results】The results showed that there was great difference in the copy numbers of both *hsp*70 and *hsp*90 among different species. The copy numbers of *hsp*70 and *hsp*90 in MED and MEAM1 cryptic species were much higher than those in *T. vaporariorum* and AsiaⅡ1, and those in AsiaⅡ1 were the lowest. Moreover, for the same species the copy numbers of *hsp*70 and *hsp*90 in female whiteflies were 2-fold as high as those in male adults. 【Conclusion】There is a relationship between the copy numbers of Hsp genes and thermal tolerance in *B. tabaci* cryptic species and *T. vaporariorum*. The results provide further information in understanding the mechanisms of different heat tolerance for different species or different sexes of whiteflies.

Key words: *Bemisia tabaci*; *Trialeurodes vaporariorum*; heat shock gene; thermal tolerance; real-time PCR; copy number

基金项目：国家自然科学基金项目(31100269)；国家“973”计划项目(2009CB119200)；公益性行业(农业)科研专项(201303019)
作者简介：韦姣，女，1989 年 11 月生，江苏常州人，硕士研究生，研究方向为生物安全，E-mail：weijiao2346@163.com
* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail：wanfanghao@caas.cn
收稿日期 Received：2014-01-27；接受日期 Accepted：2014-05-19

粉虱属于半翅目(Hemiptera)粉虱科(Aleyrodidae),是一类体型微小的植食性刺吸类害虫,主要集中在热带和亚热带地区(Mound and Halsey, 1978)。至2007年,记载的粉虱有1 556种(Martin and Mound, 2007),其中报道最多、为害最为严重的是烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Gennadius)和温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood)。烟粉虱是一个包含30个以上隐种的物种复合体(Dinsdale *et al*., 2010; De Barro *et al*., 2011; Hu *et al*., 2011)。例如,MED(Mediterranean)和MEAM1(Middle East Asia Minor 1)隐种具有很强的入侵性,属于全球入侵种,分别起源于地中海和中东-小亚细亚(Dinsdale *et al*., 2010; De Barro *et al*., 2011; Hu *et al*., 2011),现已广泛分布于世界各地,号称"超级害虫",给许多国家和地区的农作物造成了毁灭性的灾害。又如,AsiaⅡ1隐种起源于亚洲,属于中国本地种,在中国浙江最早记录,分布于中国海南、广东、广西、台湾、贵州及浙江(刘银泉和刘树生,2012)。温室粉虱属于入侵种,一般认为,温室粉虱起源于南美巴西和墨西哥一带,后传入美国和加拿大,再由此传入欧洲,到20世纪60年代,温室粉虱传入亚洲,现在世界范围内广泛分布(Russell, 1948, 1963; Hill, 1987)。温室粉虱及烟粉虱MED和MEAM1隐种在我国各地均有分布,其中温室粉虱主要在东北、华北和西北发生(崔旭红,2007),烟粉虱MED和MEAM1隐种在全国均能猖獗为害多种经济作物,如蔬菜、棉花和花卉等,且在华东、华南地区逐渐取代本地种成为优势种(Hu *et al*., 2011)。烟粉虱和温室粉虱、以及烟粉虱不同隐种具有相似的生境环境特点,但存在区域分布差异。温度是决定物种分布和扩散区域的重要影响因子(Cossins and Bowler, 1987; Bale *et al*., 2002; Hoffmann *et al*., 2003; Sorte and Hofmann, 2005; Deutsch *et al*., 2008),由此可见,对温度适应能力差异差亦是烟粉虱和温室粉虱以及烟粉虱入侵种与本地种间区域分布差异的关键因素之一。烟粉虱MED和MEAM1隐种比温室粉虱具有更强的高温适应能力(余昊,2009),比本地种AsiaⅡ1隐种具有更强的温度适应能力(Yu *et al*., 2012)。随着全球温度的变化,它们在不同地理环境下的成功适应,已经广泛引起了人们对粉虱入侵机制的理论探讨,对于其生态适应性的分子机制更是近几年来的研究热点之一。

自然界中,不同的物种分化出不同的生态位。同一物种的种群由于受到气候变化的影响也存在季节性波动,这些都反映了生物对栖境特征和热能的不同需求(Hoffmann *et al*., 2003; Sørensen *et al*., 2005)。昆虫对不同气候环境的适应能力决定了其在一个环境下的分布和丰度。温度是影响昆虫生长发育的一个重要环境因子。昆虫适应不同的环境温度有赖于其耐热性的强弱,已有研究表明,热激蛋白(heat shock proteins, HSPs)的分子伴侣作用是其获得耐热性的一个重要来源。热激蛋白是在有机体受到高温等逆境刺激后大量表达的一类蛋白质,能够防止体内蛋白质的变性,恢复其原有的空间构象和生物学功能,有助于生物体减轻逆境胁迫引起的伤害,从而赋予生物耐热性。研究发现,生物体耐热性的提高与其体内HSPs的积累存在着很大的关系(Parsell and Lindquist, 1994; Sørensen *et al*., 1999, 2001)。经过高温处理的黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 成虫,其体内HSP70的表达水平随处理时间的延长而增多(Dahlgaard *et al*., 1998)。另外,在培养的果蝇 *D. melanogaster* 细胞中注入 *hsp*70,该细胞会在更短的时间内具有耐热性,而当注入抑制热激蛋白表达的基因时,将在较长的时间内才具有耐热性(Solomon *et al*., 1991)。因此,生物体内HSP的不同丰度,可以反映物种对于高温等逆境胁迫的耐受能力。热激蛋白虽广泛存在于生物界,结构高度保守,但已有研究显示热激蛋白基因序列存在着一定的变异,且这种变异与物种所处的环境有一定的联系。研究发现,昆虫种群的适应温度、气候和纬度变化与热激蛋白基因的序列特点及表达差异有一定关联(Gehring and Wehner, 1995; Sørensen and Loeschcke, 2002; Frydenberg *et al*., 2003)。Huang和Kang (2007)在研究两种近源斑潜蝇后发现热激蛋白基因mRNA诱导表达的温度阈值与两种斑潜蝇对温度的适应性以及地理分布界限密切相关。Evgen′ev等(2004)发现 *hsp*70 的拷贝数差异与不同纬度果蝇种群的温度耐受能力有潜在的联系。这些发现表明热激蛋白基因在影响物种长期适应环境变化的过程中受到了自然选择作用。由此可推测,Hsps基因变异在烟粉虱和温室粉虱季节发生以及烟粉虱不同隐种地理分布差异中起着重要作用。

生物体内的HSP分为组成型和诱导型两种,前者在正常条件下就存在于细胞中,后者在受到胁迫时会大量合成。本实验利用使用Taqman探针的绝对定量PCR技术,建立了一套实时荧光定量检测粉虱Hsp基因的反应体系,检测了烟粉虱3个隐种和

温室粉虱基因组 DNA 中 *hsp*70 和 *hsp*90 的拷贝数，以期进一步揭示这 4 种粉虱的耐热性差异与热激蛋白基因拷贝数间的关系，获得 Hsp 基因的含量特点与粉虱温度逆境耐受性的关系，进而从基因差异角度建立导致入侵扩张能力不同的一个生物入侵机制理论，以解释烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种快速扩张并替代本土 AsiaⅡ1 隐种以及温室粉虱的原因。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

烟粉虱 MED 隐种、MEAM1 隐种和温室粉虱，来自中国农业科学院植物保护研究所生物入侵研究室长期饲养的种群，寄主植物分别为番茄 *Lycopersicon lycopersicum* Mill.（中杂 9 号）（购自北京中蔬园艺良种研究开发中心）和芹菜 *Apium graveolens* Linn.（博克西芹）（购自北京嘉禾千秋农业技术研究所），无用药史，饲养温度为 26 ± 1℃，相对湿度为 60% ~80%，光周期为 16L∶8D。烟粉虱 AsiaⅡ1 隐种由浙江大学昆虫科学研究所刘树生教授课题组惠赠，并在本实验室温室建立种群长期饲养，饲养条件同上。

1.2　主要试剂及仪器

荧光定量试剂盒 *Premix Ex Taq*™（Probe qPCR）购自宝生物工程（大连）有限公司，TransStartTaq DNA Polymerase、凝胶回收试剂盒购自 Transgen 公司。质粒提取试剂盒购自爱思进生物技术（杭州）有限公司。实验中所用引物、探针和测序均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成和完成。PCR 仪为美国 MJ 公司的 PTC-200，实时荧光定量 PCR 仪为美国 ABI 公司的 ABI 7500。

1.3　DNA 提取

烟粉虱成虫 DNA 提取液的配方为：200 mL 0.05 mol/L Tris-HCl，0.7564 g KCl，900 μL 0.45% Tween 20，900 μL 0.45% NP 40，0.4 g 0.2% gelatin，将以上试剂混匀后，放置 4℃ 冰箱过夜。实验时，取上述提取液 1 mL，加入 4 μL Proteinase K 混匀后即为裂解液。取烟粉虱成虫，在解剖镜下鉴定雌雄后，吸取 20 μL 裂解液置于 Parafilm 膜上，将单头烟粉虱成虫置于该裂解液中，充分研磨至匀浆，然后将匀浆液吸入 0.2 mL 的 PCR 管中，再利用 10 μL 裂解液清洗 3 次，并将清洗液移入同一 PCR 管中，短暂离心后，利用 PCR 仪进行金属浴。金属浴程序为：65℃ 20 min，65℃ 20 min，短暂离心，充分混匀后，25℃ 2 min，96℃ 10 min。实验结束后，将获得的 DNA 溶液放置于 -20℃ 保存以备用。

1.4　温室粉虱和烟粉虱隐种鉴定

实验室温室所饲养的烟粉虱各隐种和温室粉虱由于人为操作因素可能存在种群混淆，因此需用分子技术定期检测以确保种群纯度。根据线粒体细胞色素氧化酶 COI 基因保守区域片段大小，利用烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种特异性引物（表 1）进行 PCR 扩增反应来区分烟粉虱 MED 隐种和 MEAM1 隐种；利用通用引物（表 1）进行 PCR 扩增并测序来区分烟粉虱 AsiaⅡ1 隐种和温室粉虱。PCR 反应体系为 30 μL，其中 ddH_2O 22.8 μL，10 × buffer 3 μL（含 Mg^{2+}），dNTPs 0.6 μL，正反向引物各 1.2 μL，Taq 酶 0.6 μL，DNA 模板 0.6 μL；PCR 反应条件：94℃ 2 min；94℃ 30 s，64℃ 1 min，72℃ 1 min，35 轮循环；72℃ 10 min。反应结束后取 5 μL 的 PCR 产物，利用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳检测，其中检测条带在 500 bp 左右的为 MEAM1 隐种，300 bp 左右的为 MED 隐种。烟粉虱 AsiaⅡ1 隐种和温室粉虱条带大小在 800 bp 左右，将 PCR 产物直接送上海生工生物工程技术服务有限公司测序，序列在 NCBI 上比对后，确定烟粉虱 AsiaⅡ1 隐种和温室粉虱。

表 1　鉴定烟粉虱隐种和温室粉虱（TV）所用引物

Table 1　Primers for the identification of *Bemisia tabaci* cryptic species and *Trialeurodes vaporariorum*（TV）

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence	文献 References	鉴定的物种 Identified species
MEAM1-COI	F：CTAGGGTTTATTGTTTGAGGTCATCATATATTC R：AATATCGACGAGGCATTCCCCCT	Shatters *et al*., 2009	*B. tabaci* MEAM1
MED-COI	F：CTTGGTAACTCTTCTGTAGATGTGTGT R：CCTTCCCGCAGAAGAAATTTTGTTC	Shatters *et al*., 2009	*B. tabaci* MED
TV/Asia Ⅱ1-COI	F：TTGATTTTTTGGTCATCCAGAAGT R：TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	Simon *et al*., 1994	*T. vaporariorum*; *B. tabaci* AsiaⅡ1

1.5　绝对定量 PCR 引物和探针设计

从 NCBI 数据库下载烟粉虱 MED（*hsp*70，HM013709；*hsp*90，HM013710）、MEAM1（*hsp*70，EU934240；*hsp*90，EU934241）和 AsiaⅡ1（*hsp*70，

HM367079；*hsp*90，HM367080）隐种热激蛋白基因的 mRNA 序列，以及温室粉虱 *hsp*70（EU934244）和 *hsp*90（EU934245）基因的 mRNA 序列，应用 Primer Premier 5.0 在序列编码区分别设计 1 对外围引物，应用 Primer Express 3.0 在这对外围引物序列间再设计 1 对定量引物和探针（表 2）。

表 2　检测粉虱 *hsp*70 和 *hsp*90 拷贝数的绝对定量 PCR 引物和探针序列

Table 2　Absolute quantification PCR primers and probe sequences for detecting the copy numbers of *hsp*70 and *hsp*90 in whiteflies

物种 Species	靶基因 Target gene	外围引物序列(5′-3′) Out-primer sequence	绝对定量 PCR 引物序列(5′-3′) Absolute quantification PCR primer sequence	探针序列(5′-3′) Probe sequence	产物大小(bp) Product size
MEAM1/MED	*hsp*70	F：TGTACTACGTGCGCTAAAC R：ATGAGTCGCTCGGTGTCTG	F：AGTGGAAATCATCGCCAATGA； R：GAGTCGCTCGGTGTCTGAGAA	AAGGAAACCGCACCA- CTCCCAGCT	323；56
	*hsp*90	F：GGTATGAAAGAGAGCCAGAAGCA R：TTCGTCCTCAGGCAGTTCTAATC	F：CACTGGTGAAAGCAAAGATCAAGTA； R：CGATGGGTTCGGTCATGTAGA	CTCCTCATTTGTCGAG- CG	220；75
Asia Ⅱ 1	*hsp*70	F：CTGACCTCTTCCGCTCAACCCT； R：CGTGCATTGCGCTCGACTATTT	F：GCAGTTTCAATGCCGAGAGATAG； R：CTACGGAGCAGCAGTCCAGG	CGCCACATCCACCAG- GAGAACATCTT	338；92
	*hsp*90	F：GGTATGAAAGAGAGCCAGAAGCA； R：TTCGTCCTCAGGCAGTTCTAATC	F：AGCAAAGATCAAGTAGCTAACTCCTC； R：TCTTTCATTTGCTGGACTACATATTC	AGCGAGTCAAGAAAC- GCGGTTTTGAAGT	227；88
TV	*hsp*70	F：TCAAGCACCGAAGCCAGCAT； R：CAAAGGCGCAACGTCTACCA	F：TTGAGCTCTTGTCCATGTTTGC； R：TGCTCAGATCTCTTCCGATCAAC	TCGGCCAAGGCTTTCT- CAACTGGA	373；54
	*hsp*90	F：TGAAAGCAAGGACCAAGTAG； R：GGTGATTCAACCAGCCTATT	F：TGTCCTTCATAACCTTGCACAAA； R：AGAAGGATTAGAACTCCCAGAAGATG	TTTCAAATTTGGCTTT- GTCCTCTTCCCG	301；73

TV：温室粉虱 *Trialeurodes vaporariorum*. 最后一栏中分号前的数字代表外围引物扩增产物大小，分号后的数字代表定量引物扩增产物大小。The numeral before the semicolon in the last column represents the product size using out-primers, while that after the semicolon represents the product size using absolute quantification PCR primers.

1.6　质粒提取、标准品制备

用外围引物分别扩增对应种粉虱的基因组 DNA，PCR 体系为 30 μL，组成成分和反应程序同第 1.4 节。PCR 扩增产物经电泳检测后，在紫外光下切下目标条带，利用北京全式金公司的 *EasyPure*™ Quick Gel Extraction Kit 试剂盒将 PCR 产物回收纯化。将纯化产物连接至 TransGen *pEasy* T1 Cloning Vector 并转化到 Trans1-T1 感受态细胞，接种到含 Ampicillin、X-gal 和 IPTG 的培养基培养。挑取白色单菌落培养，选取重组克隆，送上海生工生物工程技术服务有限公司测序，利用 DNAMAN 软件分析序列。确定为靶标序列后，利用爱思进生物技术（杭州）有限公司的 AxyPrep 质粒 DNA 小量试剂盒提取对应基因菌株的质粒，用德国 Implen 超微量分光光度计 P330 测定浓度，并根据公式换算成拷贝数，公式为：拷贝数（copies/mL）$=6.02\times10^{23}$（copies/mol）×浓度（g/mL）/平均分子量（g/mol）。将质粒溶液按 1∶5 比例依次稀释 5 个浓度，拷贝数分别为 2×10^7，4×10^6，8×10^5，1.6×10^5 和 3.2×10^4。制得的标准品保存于 -40℃ 冰箱备用。

定量 PCR 反应体系为 10 μL，其中 Premix Ex Taq（Probe qPCR）2×5 μL，正反向引物（10 μmol/L）各 0.2 μL，ROX Reference Dye Ⅱ（50×）×40.2 μL，荧光探针溶液 0.4 μL，DNA 模板 1 μL，ddH_2O 3 μL。反应条件：95℃ 30 s；95℃ 5 s，60℃ 34 s，40 轮循环。反应在 7500 Real-Time PCR System 上进行。反应结束后，分析标准曲线。R^2 越接近 1 表示标准曲线的拟合程度越高，扩增效率在 95%～115% 之间，结果可信。

1.7　*hsp*70 和 *hsp*90 拷贝数定量检测

采用绝对实时荧光定量 PCR 技术检测烟粉虱 MED 隐种、MEAM1 隐种和 Asia Ⅱ 1 隐种以及温室粉虱 *hsp*70 和 *hsp*90 的拷贝数。每种粉虱分别提取 10 头雄成虫和 10 头雌成虫的基因组 DNA（即每种粉虱每种性别设置 10 个重复），每个样本 3 次技术重复，以纯净水作为模板设置阴性对照。反应体系、反应条件同 1.6 节。

1.8　数据处理与统计

绝对定量 PCR 检测结果取对数后，采用 SAS v9.1 进行统计分析。不同隐种间的雌或雄成虫的热激蛋白基因拷贝数采用 One-way ANOVA 来分析（邓肯氏检验）；同一隐种，热激蛋白基因在雌雄烟粉虱中的拷贝数采用 Independent *T*-test 来分析。所有数据均用平均数±标准误（*SE*）来表示；差异显著性检验水平为 $P=0.05$。

2　结果与分析

2.1　不同粉虱 *hsp*70 和 *hsp*90 的拷贝数差异分析

不同粉虱的雌虫的 *hsp*70 的拷贝数差异不显著,而不同粉虱雄虫中的 *hsp*70 的拷贝数存在显著差异($F3,39 = 5.84$, $P = 0.0023$)。*hsp*70 拷贝数在 4 种粉虱中分别是:雌虫:烟粉虱 MED 隐种≈1.18×MEAM1 隐种≈1.40×温室粉虱≈1.66×AsiaⅡ1 隐种;雄虫:烟粉虱 MED 隐种≈1.08×MEAM1 隐种≈1.36×温室粉虱≈2.34×AsiaⅡ1 隐种(图 1：A)。

不同粉虱的雌雄虫的 *hsp*90 的拷贝数存在差异显著(雌虫：$F3,39 = 28.01$, $P < 0.0001$；雄虫：$F3,39 = 56.66$, $P < 0.0001$)。*hsp*90 拷贝数在 4 种粉虱中分别是:雌虫:烟粉虱 MED 隐种≈1.08×MEAM1 隐种≈2.58×温室粉虱≈14.34×AsiaⅡ1 隐种;雄虫:烟粉虱 MEAM1 隐种≈1.21×MED 隐种≈2.18×温室粉虱≈10.7×AsiaⅡ1 隐种(图 1：B)。

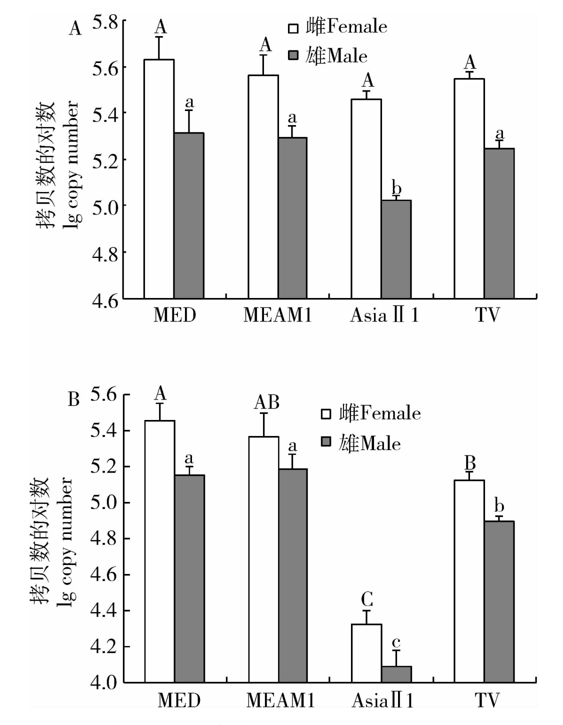


图 1　烟粉虱 3 个隐种(MED, MEAM1 和 AsiaⅡ1)以及温室粉虱(TV)成虫 *hsp*70(A)和 *hsp*90(B)拷贝数

Fig. 1　Comparison of the copy numbers of *hsp*70 (A) and *hsp*90 (B) between adults of three cryptic species of *Bemisia tabaci* complex (MED, MEAM1 and AsiaⅡ1) and *Trialeurodes vaporariorum* (TV)

图中数据为平均值±标准误；柱上不同字母表示用 One-way ANOVA 方法(邓肯氏检验)得到粉虱不同种间比较差异显著($P < 0.05$),大写字母表示雌虫间的比较,小写字母表示雄虫间的比较。Data in the figure are shown as mean ± *SE*. Different letters above bars represent significant difference among different species of whiteflies ($P < 0.05$) with One-way ANOVA (Duncan's test). The uppercase letters denote the comparison between female adults and the lowercase letters denote the comparison between male adults.

2.2　雌雄成虫 *hsp*70 和 *hsp*90 的拷贝数差异分析

研究结果表明,烟粉虱 MEAM1、MED 和 AsiaⅡ1 3 个隐种以及温室粉虱的雌虫 *hsp*70 拷贝数均显著高于雄虫拷贝数(图 2：A)。其中,烟粉虱 MEAM1 隐种：雌虫≈1.90×雄虫;MED 隐种：雌虫≈2.07×雄虫;温室粉虱：雌虫≈2.01×雄虫;AsiaⅡ1 隐种：雌虫≈2.90×雄虫。

此外,烟粉虱 MED 隐种和温室粉虱的雌虫 *hsp*90 拷贝数也显著高于雄虫拷贝数(图 2：B)。其中,烟粉虱 MEAM1 隐种：雌虫≈1.90×雄虫;MED 隐种：雌虫≈2.50×雄虫;温室粉虱：雌虫≈1.74×雄虫;AsiaⅡ1 隐种：雌虫≈1.54×雄虫。

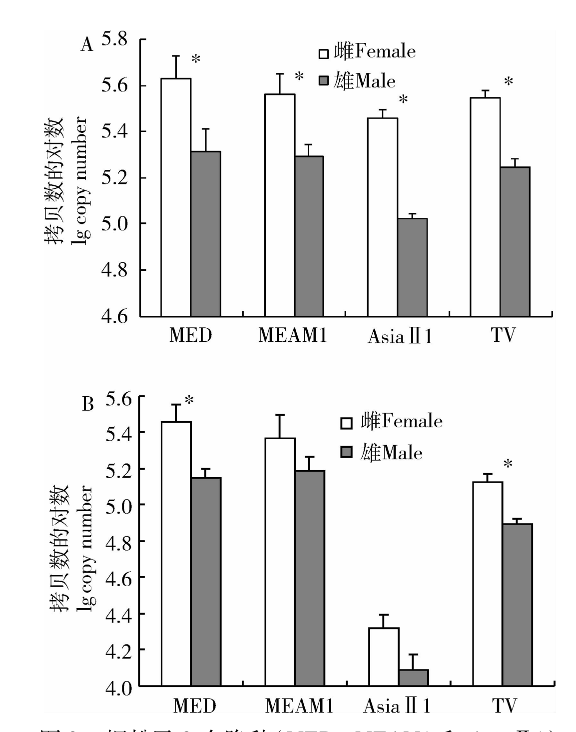


图 2　烟粉虱 3 个隐种(MED, MEAM1 和 AsiaⅡ1)以及温室粉虱(TV)雌雄成虫 *hsp*70(A)和 *hsp*90(B)拷贝数

Fig. 2　Comparison of the copy numbers of *hsp*70 (A) and *hsp*90 (B) in the female and male adults of three cryptic species of *Bemisia tabaci* complex (MED, MEAM1 and AsiaⅡ1) and *Trialeurodes vaporariorum* (TV)

柱上星号表示用 *T* 测验得到粉虱不同性别间比较差异显著($P < 0.05$)。The asterisk above bars represent significant difference among different sexes of whitefly ($P < 0.05$) with *T* test.

2.3　不同粉虱 *hsp*70 和 *hsp*90 的变异情况分析

对不同种粉虱的雌雄虫 *hsp*70 的拷贝数变异情

况分析结果显示,除了烟粉虱 MEAM1 隐种雌虫, MED 隐种雌雄虫,*hsp*70 拷贝数种内变异系数高于种间变异系数以外,其余种粉虱的雌雄虫 *hsp*70 的拷贝数种内变异系数均低于种间变异系数。

而对于不同种粉虱的雌雄虫 *hsp*90 的拷贝数变异情况分析结果则显示,所有种粉虱雌雄虫 *hsp*90 的拷贝数的种内变异系数均低于种间变异系数(表 3)。

表 3 烟粉虱 3 个隐种(MED, MEAM1 和 AsiaⅡ1)以及温室粉虱(TV)*hsp*70 和 *hsp*90 拷贝数变异系数
Table 3 Coefficient of variance of *hsp*70 and *hsp*90 in three cryptic species of *Bemisia tabaci* complex (MED, MEAM1 and AsiaⅡ1) and *Trialeurodes vaporariorum* (TV)

基因 Gene	变异系数来源 Coefficient of variance sources	物种及性别 Species and gender							
		MEAM1		MED		TV		AsiaⅡ1	
		雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male	雌 Female	雄 Male
*hsp*70	种内 Intraspecies	5.3348	3.6836	5.7745	5.7680	2.8973	2.9392	3.4982	1.9379
	种间 Interspecies	3.7074							
*hsp*90	种内 Intraspecies	7.9382	5.2470	6.0070	3.0732	3.6366	3.0057	6.2443	7.2727
	种间 Interspecies	10.1477							

3 讨论

外来入侵物种适应新生境的环境压力的能力影响其入侵的成功与否。物种对环境胁迫的耐受能力与其体内 Hsps 基因的丰度、表达以及结构等特点密切相关。目前在许多生物如昆虫、鱼类、植物和哺乳动物的研究中都发现了热激蛋白基因的表达与环境胁迫之间存在着密切的关系(Ulmasov *et al*., 1993; Gehring and Wehner, 1995; Dahlgaard *et al*., 1998; Basu *et al*., 2002; Sun *et al*., 2002)。Anderson 等(2003)发现适应于较低纬度的果蝇 *Drosophila virilis* 有 7 个 *hsp*70 拷贝,其热胁迫抗性要高于具有 5 个拷贝的 *D. lummei*,后者在分布上处于较高的纬度,提示 *hsp*70 拷贝数与果蝇耐热性强弱有关。温室粉虱是入侵我国的重要害虫之一,比较分析温室粉虱和烟粉虱两者在我国的分布可以发现,温室粉虱虽南北各省均有分布,但在北方为害更严重。烟粉虱则分布广泛,横跨 19 ~44°N (王海鸿, 2005)。具有抵抗高温的能力对于温带昆虫非常重要(Kimura *et al*., 1994)。崔旭红等(2007)发现,高温胁迫下,烟粉虱成活率、生殖力、高温耐热性等显著高于温室粉虱。相反,在低温 21 ~22℃胁迫下,温室粉虱的生命指标强于烟粉虱 MEAM1 隐种,说明温室粉虱具有比 MEAM1 隐种较强的低温耐受力。余昊(2009)研究发现,Hsps 基因在温室粉虱体内开始诱导表达的温度和表达量最高时的温度低于在烟粉虱 MEAM1 隐种体内表达的相应温度,低 2 ~6℃。本研究发现的 *hsp*70 和 *hsp*90 拷贝数在入侵型烟粉虱 MED/MEAM1 隐种中较其他两种均高,而在土著种 AsiaⅡ1 隐种中含量最低,以及温室粉虱 Hsps 基因拷贝数较入侵型烟粉虱隐种低但高于土著型烟粉虱隐种。结合烟粉虱这 3 个隐种以及温室粉虱对温度耐受能力不同的生物学特点,本研究结果提示了不同种的粉虱体内 *hsp*70 和 *hsp*90 拷贝数与其耐热性强弱可能呈正相关关系,暗示了耐热性更强的入侵型粉虱在适应新环境的过程中,受到环境压力的选择作用,进化形成更多的 Hsp 基因拷贝数,以便在恶劣的环境胁迫下,能诱导更多的热激蛋白基因表达,从而获得了更强的抗逆性。

物种在长期适应进化过程中,极端温度的长期选择会影响到物种的温度适应性,从而使其群体获得能够保持和遗传的环境胁迫抵抗力,最终使该物种在竞争中存活下来(Bale *et al*., 2002; Hoffman *et al*., 2003)。生物体的耐热性与调节热适应性基因的结构密切相关(Bettencourt *et al*., 2002; Hoffmann *et al*., 2003)。有研究发现来自美国气候环境差异较大的两个州——亚利桑那州和华盛顿州的两个果蝇地理种群,其热激蛋白复合物具有高度的分化现象(Graham *et al*., 2012),统计分析结果显示这可能是由局部的自然选择作用引起的。目前,全球许多地区已经发现烟粉虱 MEAM1 隐种竞争并取代土著种的现象。据报道,我国大部分地区已发现烟粉虱 MED 隐种,烟粉虱 MEAM1 隐种正逐步取代 Asia Ⅱ 3 和 AsiaⅡ1 等烟粉虱本土隐种。余昊(2009)研究发现,Hsps 基因在烟粉虱 AsiaⅡ1 隐种体内开始诱导表达的温度和表达量最高时的温度低于在烟粉虱 MEAM1 和 MED 隐种体内表达的相应温度,低约

2℃。本研究结果显示,MED 隐种和 MEAM1 隐种体内的 *hsp*70 和 *hsp*90 的拷贝数均显著高于 AsiaⅡ1 隐种,暗示入侵种在面对新的胁迫环境条件时,可能通过进化产生更多热激蛋白基因从而使其在逆境下表达数量增多,进而提高温度耐受力的不同于本土种的适应性对策。

此外,许多研究发现高温胁迫下,多数物种存在雌性比雄性耐热的现象。如黑腹果蝇 *D. melanogaster* (Dahlgaard *et al*., 1998; Lansing *et al*., 2000)、果蝇 *Drosophila buzzatii* (Sørensen *et al*., 1999, 2005; Sarup *et al*., 2006)和埃及伊蚊 *Aedes aegypti* (Andersen *et al*., 2006)。崔旭红等(2008)发现,烟粉虱 MEAM1 隐种雌成虫在高温热激下,雌成虫的存活率显著高于雄成虫。吕志创等研究表明烟粉虱雌性比雄性耐热是由多基因调控的(Lü and Wan, 2008);高温处理下,烟粉虱雌成虫 *hsp*70 mRNA 表达量高于雄成虫,且通过进一步的 RNAi 证明 *hsp*70 在烟粉虱 MEAM1 隐种雌性耐热中起关键的作用(Lü and Wan, 2011)。本研究发现,烟粉虱各隐种和温室粉虱的雌虫 *hsp*70 拷贝数均显著高于雄虫拷贝数,进一步为 *hsp*70 在烟粉虱雌性比雄性耐热中起关键作用提供更充分的证据。至于 *hsp*90 在粉虱雌雄虫中的作用可能较为复杂。有研究报道 *hsp*90 在烟粉虱 MEAM1 隐种雌性耐热中不起作用,以及雌性和雄性 *hsp*90 mRNA 表达水平无显著差别(Lü and Wan, 2011),本研究发现烟粉虱 MEAM1 隐种雌雄成虫 *hsp*90 拷贝数不存在显著性差异,进一步暗示了 *hsp*90 在烟粉虱 MEAM1 隐种雌性的耐热性中可能并不是关键因素。至于 *hsp*90 拷贝数与烟粉虱 MED 隐种、AsiaⅡ1 隐种以及温室粉虱雌性耐热的关系如何,需要结合 RNAi 实验来进一步研究探讨。

以上研究结果表明,不同种粉虱以及烟粉虱不同隐种的 *hsp*70 和 *hsp*90 的拷贝数与其耐热性之间存在一定的关系,雌虫 *hsp*70 和 *hsp*90 拷贝数约为雄虫的 2 倍。本研究为解释烟粉虱不同隐种和不同性别的耐热性机制提供了进一步的依据,但只初步明确了烟粉虱 3 个隐种及温室粉虱的耐热性与其热激蛋白基因拷贝数之间存在的联系,其机制如何以及热激蛋白是否对生物体耐热性有其他方面的作用,尚不清楚,需要后续的实验加以探讨。

参考文献(References)

Andersen JP, Schwartz A, Gramsbergen JB, Loeschcke V, 2006. Dopamine levels in the mosquito *Aedes aegypti* during adult development, following blood feeding and in response to heat stress. *Journal of Insect Physiology*, 52(11–12): 1163–1170.

Anderson AR, Collinge JE, Hoffmann AA, Kellett M, McKechnie SW, 2003. Thermal tolerance trade-offs associated with the right arm of chromosome 3 and marked by the hsr-omega gene in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 90(2): 195–202.

Bale JS, Masters GJ, Hodkinson ID, Awmack CS, Bezemer TM, Brown VK, Butterfield J, Buse A, Coulson JC, Farrar J, Good JEG, Harrington R, Hartley S, Jones TH, Lindroth RL, Press MC, Symrnioudis I, Watt AD, Whittaker JB, 2002. Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biology*, 8(1): 1–16.

Basu N, Todgham AE, Ackerman PA, Bibeau MR, Nakano K, Schulte PM, Lwama GK, 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, 295(2): 173–183.

Bettencourt BR, Kim IY, Hoffmann AA, Feder ME, 2002. Response to natural and laboratory selection at the *Drosophila hsp*70 genes. *Evolution*, 56(9): 1796–1801.

Cossins AR, Bowler K, 1987. Temperature Biology of Animals. Chapman and Hall, New York.

Cui XH, 2007. Adaptation of Two Whitefly Species, *Bemisia tabaci* (Gennadius) B-biotype and *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae), to Thermal Stress: Temperature Responses and Molecular Mechanisms. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [崔旭红, 2007. B 型烟粉虱和温室粉虱热胁迫适应性及其分子生态机制. 北京: 中国农业科学院博士学位论文]

Cui XH, Xie M, Wan FH, 2007. Changes in expression level of heat shock protein 70 gene in *Bemisia tabaci* B-biotype (Homoptera: Aleyrodidae) under high temperature stress. *Acta Entomologica Sinica*, 50(11): 1087–1091. [崔旭红, 谢明, 万方浩, 2007. 高温胁迫下 B 型烟粉虱热激蛋白基因 *hsp*70 表达量的变化. 昆虫学报, 50(11): 1087–1091]

Cui XH, Xie M, Wan FH, 2008. Effects of brief exposure to high temperature on survival and fecundity of two whitefly species: *Bemisia tabaci* B-biotype and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Scientia Agricultura Sinica*, 41(2): 424–430. [崔旭红, 谢明, 万方浩, 2008. 短时高温暴露对 B 型烟粉虱和温室白粉虱存活以及生殖适应性的影响. 中国农业科学, 41(2): 424–430]

Dahlgaard J, Loeschcke V, Michalak P, Justesen J, 1998. Induced thermotolerance and associated expression of the heat shock protein Hsp70 in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, 12(5): 786–793.

De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB, 2011. *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56: 1–19.

Deutsch CA, Tewksbury JJ, Huey RB, Sheldon KS, Ghalambor CK, Haak DC, Martin PR, 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(18):

6668 – 6672.

Dinsdale A, Cook L, Riginos C, Buckley YM, De Barro P, 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(2): 196 – 208.

Evgen'ev MB, Zatsepina OG, Garbuz D, Lerman DN, Velikodvorskaya V, Zelentsova E, Feder ME, 2004. Evolution and arrangement of the *hsp*70 gene cluster in two closely related species of the *virilis* group of *Drosophila*. *Chromosoma*, 113(5): 223 – 232.

Frydenberg J, Hoffmann AA, Loeschcke V, 2003. DNA sequence variation and latitudinal associations in *hsp*23, *hsp*26 and *hsp*27 from natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 12(8): 2025 – 2032.

Gehring WJ, Wehner R, 1995. Heat shock protein synthesis and thermotolerance in *Cataglyphis*, an ant from the Sahara desert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92: 2994 – 2998.

Graham AM, Merrill JD, Mcgaugh SE, Noor MAF, 2012. Geographic selection in the small heat shock gene complex differentiating populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Journal of Heredity*, 103(3): 400 – 407.

Hill DS, 1987. Agricultural Insect Pests of Temperate Regions and Their Control. Cambridge University Press, Cambridge. 210.

Hoffmann AA, Sørensen GJ, Loeschcke V, 2003. Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *Journal of Thermal Biology*, 28(3): 175 – 216.

Hu J, De Barro P, Zhao H, Wang J, Liu SS, 2011. An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. *PLoS ONE*, 6(1): e16061.

Huang LH, Kang L, 2007. Cloning and inter-specific altered expression of heat shock protein genes in two leaf miner species in response to thermal stress. *Insect Molecular Biology*, 16(4): 491 – 500.

Kimura MT, Ohtsu T, Yoshida T, Awasaki T, Lin FJ, 1994. Climatic adaptations and distributions in the *Drosophila takahashii* species subgroup (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Natural History*, 28(2): 401 – 409.

Lansing E, Justesen J, Loeschche V, 2000. Variation in the expression of Hsp70, the major heat-shock protein, and thermotolerance in larval and adult selection lines of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Thermal Biology*, 25(6): 443 – 450.

Lin YJ, Seroude L, Benzer S, 1998. Extended life-span and stress resistance in the *Drosophila* mutant methuselah. *Science*, 282: 934 – 946.

Liu YQ, Liu SS, 2012. Species status of *Bemisia tabaci* complex and their distributions in China. *Journal of Biosafety*, 21(4): 247 – 255. [刘银泉, 刘树生, 2012. 烟粉虱的分类地位及在中国的分布. 生物安全学报, 21(4): 247 – 255]

Lü ZC, Wan FH, 2008. Differential gene expression in whitefly (*Bemisia tabaci*) B-biotype females and males under heat-shock condition. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D*, 3(4): 257 – 262.

Lü ZC, Wan FH, 2011. Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Journal of Experimental Biology*, 214: 764 – 789.

Martin JH, Mound LA, 2007. An annotated check list of the world's whiteflies (Insecta: Hemiptera: Aleyrodidae). *Zootaxa*, 1492: 1 – 84.

Mound LA, Halsey SH, 1978. Whitefly of the World. A Systematic Catalogue of the Aleyrodidae (Homoptera) with Host Plant and Natural Enemy Data. British Museum and John Wiley and Sons, Chichester. 1 – 340.

Parsell DA, Lindquist S, 1994. Heat shock proteins and stress tolerance. In: Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulous C eds. The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Russell LM, 1948. The North American species of whiteflies of the genus *Trialeurodes*. *U. S. Department of Agriculture*, 635: 1 – 85.

Russell LM, 1963. Hosts and distribution of five species of *Trialeurodes* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 56: 149 – 153.

Sarup P, Sørensen JG, Dimitrov K, Barker JSF, Loeschcke V, 2006. Climatic adaptation of *Drosophila buzzatii* populations in southeast Australia. *Heredity*, 96: 479 – 486.

Shatters RGJr, Powell CA, Boykin LM, He LS, Mckenzie CL, 2009. Improved DNA barcoding method for *Bemisia tabaci* and related Aleyrodidae: development of universal and *Bemisia tabaci* biotype-specific mitochondrial cytochrome c oxidase I polymerase chain reaction primers. *Journal of Economic Entomology*, 102(2): 750 – 758.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of Entomological Society of America*, 87(6): 651 – 701.

Solomon JM, Rossi JM, Golic K, McGarry T, Lindquist S, 1991. Changes in *hsp*70 alter thermotolerance and heat-shock regulation in *Drosophila*. *The New Biologist*, 3(11): 1106 – 1120.

Sørensen JG, Dahlgaard J, Loeschcke V, 2001. Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Functional Ecology*, 15(3): 289 – 296.

Sørensen JG, Loeschcke V, 2002. Natural adaptation to environmental stress via physiological clock-regulation of stress resistance in *Drosophila*. *Ecology Letters*, 5(1): 16 – 19.

Sørensen JG, Michalak P, Justesen J, Loeschcke V, 1999. Expression of the heat-shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance. *Hereditas*, 131(2): 155 – 164.

Sørensen JG, Norry FM, Scannapieco AC, Loeschcke V, 2005. Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *Journal of*

Evolutionary Biology, 18(4): 829 - 837.

Sorte CJB, Hofmann GE, 2005. Thermotolerance and heat-shock protein expression in Northeastern Pacific *Nucella* species with different biogeographic ranges. *Marine Biology*, 146: 985 - 993.

Sun WN, Montagu MV, Verbruggen N, 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577 (1): 1 - 9.

Ulmasov HA, Karaev KK, Lyashko VN, Evgen'ev MB, 1993. Heat-shock response in camel (*Camelus dromedarius*) blood-cells and adaptation to hyperthermia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 106(4): 867 - 872.

Wang HH, 2005. Molecular Cloning and Bacterial Expression of Heat Shock Proteins and Their Relationship with Stress Tolerance in *Bemsia tabaci* (B Biotype). PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [王海鸿, 2005. B 型烟粉虱热休克蛋白基因的克隆和表达及其与胁迫耐受性关系的研究. 北京: 中国农业科学院博士学位论文]

Yu H, 2009. Gene Expression and Their Functions of Heat Shock Proteins in Invasion Whiteflies. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [余昊, 2009. 入侵粉虱热激蛋白基因表达与功能. 北京: 中国农业科学院博士学位论文]

Yu H, Wan FH, Guo JY, 2012. cDNA cloning of heat shock protein genes and their expression in an indigenous cryptic species of the whitefly *Bemisia tabaci* complex from China. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2): 293 - 302.

（责任编辑：赵利辉）